

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/53</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/39581</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Juli 2000 (06.07.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10333</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1999 (22.12.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 59 912.9 23. Dezember 1998 (23.12.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65929 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAGNER, Thomas [DE/DE]; Römerstrasse 18, D-65719 Hofheim (DE). WINDHAB, Norbert [DE/DE]; Akazienstrasse 28, D-65795 Hattersheim (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: TEST SYSTEM FOR DETECTING DIFFERENT MARKERS, AND PRODUCTION AND USE THEREOF</p> <p>(54) Bezeichnung: TESTSYSTEM ZUR ERKENNUNG VERSCHIEDENER MARKER, SEINE HERSTELLUNG SOWIE VERWENDUNG</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> </div>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a test system containing at least two detection species, which detect at least two different markers by forming a complex. The invention also relates to the production of said test system and to its use in a suitable detection method.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem, enthaltend mindestens zwei Erkennungsspezien, die mindestens zwei verschiedene Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen, seine Herstellung sowie Verwendung in einem geeigneten Nachweisverfahren.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

10 **Testsystem zur Erkennung verschiedener Marker, seine Herstellung
sowie Verwendung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem enthaltend mindestens zwei Erkennungsspezien, die mindestens zwei verschiedene Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen. seine Herstellung sowie Verwendung in einem geeigneten Nachweisverfahren.

Die Anwendungsbereiche von Testsystemen, wie z. B. Diagnostika, sind in der Biologie, Biochemie, Medizin und Pharmakologie weit verbreitet. Vor allem in der Medizin ist eine zuverlässige und eindeutige Diagnose von Krankheiten, wie z. B. virale Infektionen oder Krebs, von außerordentlicher Wichtigkeit zur Steigerung der Lebensqualität, da nur durch ein frühzeitiges Erkennen einer Krankheit eine rechtzeitige und effektive Behandlung erfolgen kann. Basierend auf der Erkennung krankheitsspezifischer Marker bzw. Liganden, wie z. B. Nukleinsäuresequenzen, Proteine oder Antigene, wird der Erreger oder die Krankheit in der biologischen Probe nachgewiesen. Weit verbreitet sind Diagnostiktests, in denen jeweils ein Marker oder eine Klasse von Markern nachgewiesen wird, wie z. B. bei ELISA oder bei Amplifizierungsmethoden, wie PCR, b-DNA, Southern-, Western- oder Northern-Blotting. Die verwendeten Detektionsarten reichen von einfachen Färbungsmethoden und kalorimetrischen Methoden über Fluoreszenz-Energy-Transfer (FRET) und Fluoreszenz-Quenching bis zum Scintillation Proximity Assay (SPA).

30

Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung von nur einem Marker bzw. einer Markerklasse ist, daß leicht fälschlicherweise positive Testergebnisse entstehen, die auch zu falschen Rückschlüssen bezüglich einer bestimmten Krankheit führen. Oftmals muß daher ein zweiter

Test oder noch weitere Tests auf den gleichen oder komplementären Analyten durchgeführt werden, um eine zuverlässige Aussage bezüglich krank/gesund treffen zu können. Dies führt zu mehreren Tests, deren Ergebnisse miteinander zu vergleichen sind, was zugleich aufwendig und kostenintensiv ist.

5

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, qualitativ bessere, weniger aufwendigere und kostengünstigere Analytentests als die bereits bekannten zu entwickeln.

10 Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Verknüpfung von zwei oder mehreren Testergebnissen auf molekularer Ebene im Sinne der Bool'schen Verkettung einen qualitativ sehr guten, einfachen und kostengünstigen Analytentest erlaubt, wobei sich die verschiedenen Testergebnisse untereinander nicht im wesentlichen stören.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:

- 15 (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezie, die den ersten Marker erkennt,
- (b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezie, die sowohl den ersten Marker, wie auch den zweiten Marker erkennt,
- 20 (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezie, die den zweiten Marker erkennt,
- (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten Erkennungsspezien und Markern.

25 Des Weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:

- (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezie, die den ersten Marker erkennt,
- (b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezie, die den ersten Marker, und eine dritte Erkennungsspezie erkennt,

- (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezies, die den zweiten Marker und die zweite Erkennungsspezies erkennt,
- (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten Erkennungsspezies und Markern.

5

Zur Erhöhung der Spezifität ist es in einer weiteren Ausführungsform vorteilhaft, daß weitere Erkennungsspezies, die weitere Marker erkennen, in weiteren Behandlungsschritten eingesetzt werden, was bei einer Erweiterung auf n -Liganden mit n gleich eine natürliche Zahl $n + 1$ Erkennungsspezies zur Folge hat.

10

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen wird das Nachweisverfahren in homogener, teilhomogener (modularer) oder immobilisierter Form durchgeführt. Bei einer homogenen Ausführungsform werden schrittweise die Bindungsereignisse erzeugt und der sich eventuell gebildete Komplex in einem sogenannten Proximity Assay nachgewiesen. Dabei werden die erste und die letzte Komponente vorzugsweise so markiert, daß sie nur bei gegenseitiger Nähe ein Signal erzeugen können. Bevorzugte Detektionsverfahren sind z. B. LOCI (Ullmann, E. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5426), Fluoreszenz-Energy-Transfer (FRET) Cardullo, R.A. (1992) in „Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules“, 414-423, Springer Verlag), Fluoreszenz-Quenching (Ladokhin, A.S. (1997) „Distribution analysis of depth-dependent fluorescence quenching in membranes: a practical guide“, Methods-Enzymol., 278, 462-473) oder Scintillation Proximity Assay (SPA) (Picardo, M. & Hughes, K.T. (1997) „Scintillation proximity assays. High Throughput Screening“, Ed. Devlin, J. P.; Verlag Dekker, New York, N.Y., 307-316).

Bei einer teilhomogenen oder modularen Ausführungsform werden die Bindungsereignisse schrittweise und in Lösung erzeugt, und, sobald der Komplex sich ausgebildet hat, über eine der Komponenten an einen festen Träger gebunden. Der sich bildende Komplex wird durch eine Markierung, insbesondere eine nicht-radioaktive Markierung oder radioaktive Markierung, vorzugsweise über eine Fluoreszenzmarkierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung oder Spinmarkierung nachgewiesen (Kessler, C. (Ed.) Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules (1992), Springer Verlag, 414-423).

Bei einer immobilisierten Ausführungsform wird eine Erkennungsspezies, vorzugsweise die erste Erkennungsspezies an einen festen Träger gebunden und nachfolgend durch schrittweise Zugabe der weiteren Komponenten der Komplex aufgebaut. Die Markierung erfolgt vorzugsweise nach gleichen oder ähnlichen Methoden wie bei der teilhomogenen Ausführungsform.

Als Träger für die Immobilisierung eignen sich vor allem festes oder gelartiges Material, insbesondere Chipmaterial und/oder dünne Schichten des Materials, vorzugsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien oder (bio)molekulare Filamente, insbesondere Zellulose oder Gerüstproteine.

Die in dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren eingesetzten Erkennungsspezies und/oder Marker sind insbesondere eine synthetische Substanz, ein Naturstoff und/oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Peptid, Peptoid, Protein, Saccharid oder eine Nukleinsäure. Besonders bevorzugt sind beispielsweise ein Rezeptor oder ein funktioneller Teil davon, insbesondere ein funktioneller Teil, der aus der extrazellulären Domäne eines membranständigen Rezeptors entammt, ein Antikörper oder ein funktioneller Teil davon, insbesondere ein Fv-Fragment (Skerra & Plückthun (1988), Science 240, 1038), ein einzelkettiges Fv-Fragment (scFv; Bird et al. (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 5879) oder ein Fab-Fragment (Better et al. (1988), Science 240, 1041), ein Aptamer, beispielsweise ein DNA- oder RNA-Aptamer oder Derivate davon, beispielsweise mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehene Aptamere, ein Zellbestandteil, insbesondere ein Lipid, Glykoprotein, Filamentbestandteil, Lektin, Liposom, Mitogen, Antigen, sekundärer Metabolit oder Hapten, eine Zelle, insbesondere eine lymphoide Zelle, oder ein Virus, insbesondere ein Virusbestandteil, vor allem ein Kapsid, oder ein Viroid oder ein Derivat, insbesondere ein Acetat, oder deren wirksame Teile, oder eine einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure, insbesondere DNA, RNA, p-RNA (Pitsch, S. et al., Helv. Chim. Acta. (1993), 76, 2161; Pitsch, S. et al., Helv. Chim. Acta. (1995), 78, 1621), p-DNA (DE 198 37 387.2), PNA (peptidische Nukleinsäure (Nielsen, P.E. et al. (1991) Science, 254, 1497), CNA (Aminocyclohexylnukleinsäure; PCT/EP98/06002) oder ein Aptamer (siehe z. B. Bock, L.C. et al. (1992) Nature, 355, 564) oder Hybride der genannten Substanzen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung zählen Aptamere aufgrund ihrer Bindungseigenschaften an spezifische von Nukleinsäuren unterschiedliche Moleküle, wie z. B. Proteine, nicht zu den Nukleinsäuren, sondern zu Antikörper-Derivaten. Bevorzugt sind DNA-Aptamere oder RNA-Aptamere.

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren einschließlich Aptamere können auch modifiziert sein. Hierzu sind die dem Fachmann aus der Nukleinsäurechemie bekannten Methoden anwendbar. Bevorzugt sind Modifikationen, die zu einer Stabilisierung der Nukleinsäuren führen (siehe z. B. Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90. 543, No. 4).

10

Üblicherweise erfolgt die Erkennung eines Markers durch eine Erkennungsspezies über nicht-kovalente Wechselwirkungen, insbesondere über Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelungen, Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe, Van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen. Beispielsweise wird eine Nukleinsäure als Marker durch eine vollständig oder teilweise komplementäre Nukleinsäure erkannt oder eine synthetische Substanz, wie z. B. eine Chemikalie, ein Naturstoff und/oder ein Naturstoffderivat als antigene Stoffe werden von einem entsprechenden Antikörper oder Antikörper-Derivat erkannt. Gemäß dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren können die Marker jeder beliebigen Substanzklasse angehören, vorzugsweise jedoch aus mindestens zwei verschiedenen.

15

20

Gemäß dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren ist des Weiteren mindestens eine Erkennungsspezies markiert, vorzugsweise sind alle Erkennungsspezies markiert, vor allem sind mindestens zwei Erkennungsspezies unterschiedlich markiert. Wie bereits oben näher erläutert, kann die Markierung je nachdem ob es sich um eine homogene, teilhomogene (modulare) oder immobilisierte Ausführungsform handelt, nicht-radioaktiv oder radioaktiv sein, vorzugsweise LOCI, FRET, Fluoreszenz-Quenching, SPA, eine Fluoreszenzmarkierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung oder Spin-Markierung.

25

30

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der Marker und/oder das Signal amplifiziert werden, was zu einer Erhöhung der Sensitivität des Nachweisverfahrens führt. Die Amplifizierung des Markers betrifft insbesondere die Amplifizierung von Nukleinsäuren, beispielsweise durch PCR, NASBA, LCR, SDA, Q β -Replikation oder RT-PCR (Kessler, C.

(1992) supra). Die Signalamplifizierung wird beispielsweise durch sog. Cross-Linking von Bindungspartnern, Antikörper- oder Nukleinsäure-Bäumen (z. B. b-DNA), katalytische Substratumsetzung (z. B. alkalische Phosphatase, Peroxidase, β -Galaktosidase) oder Signalkaskaden erreicht.

5

Neben der genannten in vitro Amplifizierung ist auch eine in vivo Amplifizierung, z. B. Detektion von r-RNA, indirekte Detektion von Antigenen, möglich.

10

Grundsätzlich kann man die Marker in zwei Klassen aufteilen. Bei sog. Positivmarkern wird das Fehlen dieser Marker nachgewiesen, z. B. über das Fehlen eines Signals. Positive Marker beziehen sich im allgemeinen auf in einem gesunden Organismus vorhandene Marker, z.B. m-RNA. Als negative Marker werden im allgemeinen die Substanzen eines Pathogens oder eines kranken Organismus bezeichnet, der über das erfindungsgemäße Nachweisverfahren bestimmt werden kann.

15

20

25

Gemäß dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren können entweder zwei oder mehrere negative, zwei oder mehrere positive oder zwei oder mehrere positive und negative Marker nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt somit entweder über das Auftreten oder über das Fehlen eines Signals. Ebenso ist eine Verdrängung eines Signals z.B. durch das Verdrängen eines Moleküls aus einem Komplex oder aus seiner bindenden Konformation (z.B. Molecular Beacons, S. Tyaki, Kramer F. R., Nature Biotechnology 14, 303-308, 1996; R.P. Ekins, Clinical Chemistry, 44/9, 2015-2030, 1998) in einem kompetitiven Assay möglich. Hierzu wird eine Substanz dem Testsystem zugegeben, die einen der nachzuweisenden Marker verdrängt, wobei der aus Markern und Erkennungsspezien aufgebaute Molekülkomplex und damit auch das damit verbundene Signal verschwindet. Über eine Titration läßt sich somit auf einfache Art und Weise die Konzentration des verdrängten Markers bestimmen.

Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren kann nun in mindestens einer der folgenden alternativen Ausführungsformen vorliegen, die besonders bevorzugt sind:

30

1. Mindestens ein Marker ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jede weitere Marker ist eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, Naturstoff oder Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen.

5

2. Der erste Marker und jeder weitere Marker ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen.

10

3. Eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure als Marker wird von einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure als Erkennungsspezies erkannt.

- 15 4. Eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat wird von einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise von einem Antikörper oder einem Antikörper-Derivat als Erkennungsspezies erkannt.

- 20 5. Mindestens eine Erkennungsspezies ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jede weitere Erkennungsspezies ist eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder ein Antikörper-Derivat.

- 25 6. Die erste Erkennungsspezies und jede weitere Erkennungsspezies ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder ein Antikörper-Derivat.

30

7. Mindestens eine Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure.

5

8. Mindestens eine Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat und einer anderen synthetischen Substanz, einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat.

- 10 9. Mindestens eine Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, einem verschiedenen Naturstoff oder einem verschiedenen Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat.

15

10. Eine erste Erkennungsspezies ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure, eine zweite Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise einem Antikörper oder Antikörper-Derivat.

20

11. Eine erste Erkennungsspezies ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure, eine zweite Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure, und die dritte Erkennungsspezies ist eine weitere andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure.

25

12. Eine erste Erkennungsspezies ist eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat, eine zweite Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff

30

oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise einem Antikörper oder Antikörper-Derivat, und einer anderen synthetischen Substanz einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat, vorzugsweise einem anderen Antikörper oder Antikörper-Derivat, und eine dritte Erkennungsspezies ist eine weitere andere synthetische Substanz, ein weiterer anderer Naturstoff oder ein weiteres anderes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein weiterer anderer Antikörper oder ein weiteres anderes Antikörper-Derivat.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Testsystem enthaltend mindestens zwei Erkennungsspezies, die mindestens zwei verschiedene Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen, vorzugsweise die oben bereits beschriebenen Erkennungsspezies bzw. Marker. In einer bevorzugten Ausführungsform ist mindestens eine Erkennungsspezies an einem Träger, wie vorzugsweise oben bereits näher beschrieben, immobilisiert.

Das erfindungsgemäße Testsystem kann in folgenden bevorzugten Ausführungsformen eingesetzt werden:

1. Mindestens eine Erkennungsspezies ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und mindestens eine andere Erkennungsspezies ist eine andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure.
2. Mindestens eine Erkennungsspezies ist eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat, und mindestens eine andere Erkennungsspezies ist eine andere von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat.
3. Mindestens eine Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer von einer

Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörperderivat.

4. Mindestens eine Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure.

5. Mindestens eine Erkennungsspezies ist ein Hybrid aus einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat und einer anderen von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat.

Das erfindungsgemäße Testsystem läßt sich beispielsweise dadurch herstellen, daß die für die einzelnen Ausführungsformen notwendigen Erkennungsspezies zusammengestellt werden, bzw. daß mindestens eine Erkennungsspezies an einen Träger, wie oben bereits vorzugsweise beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren immobilisiert wird.

Das erfindungsgemäße Testsystem läßt sich in dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren, wie oben näher beschrieben, einsetzen. Insbesondere dient es zum Nachweis von An- und/oder Abwesenheit von mindestens zwei verschiedenen Markern in einer Probe. Vorzugsweise liegt es in Form eines Diagnostikums oder eines Analyten vor. Es dient daher insbesondere für den Nachweis von Erkrankungen oder für die Umweltanalytik, insbesondere zum Nachweis von Toxinen und/oder Allergenen.

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

5 Fig. 1 zeigt schematisch den Nachweis von zwei Analyten (A und B) in einem Assay in der immobilisierten Ausführungsform.

Fig. 2 zeigt schematisch den Nachweis von zwei Analyten (Antigene A und B) in einem Assay in der immobilisierten Ausführungsform.

10 Fig. 3 zeigt schematisch den Nachweis von zwei Analyten (Nukleinsäure A und B) in einem Assay in der immobilisierten Ausführungsform.

Fig. 4 zeigt schematisch den Komplex aus Markern und Erkennungsspezien gemäß Beispiel 1.

15

Fig. 5 zeigt schematisch den Komplex aus Markern und Erkennungsspezien gemäß Beispiel 2.

BEISPIELE

20

Gleichzeitige Detektion einer Desoxyribonucleinsäure und eines markierten Antikörper-Antigens.

Ausgangsverbindungen:

25 Die für das Beispiel benötigten Reagenzien, wie Texas-Red® markiertes Oligonukleotidkonjugat (24-mer DNA; Fa. Interactiva; DNA 1), ein biotinyliertes Oligonukleotidkonjugat (24-mer DNA; Fa. Interactiva; DNA 3); ein synthetisches Oligonukleotid (57-mer DNA; Fa. Interactiva; DNA 2), das zu den beiden anderen DNAs komplementäre Sequenzen besitzt, Streptavidin-konjugiertes anti-Human IgG F(ab')₂ (Ziege; Fa. Rockland) und ein Fluorescein-

markiertes human IgG F(ab')₂-Fragment (Fa. Rockland) als Antigen, sind alle käuflich erhältlich

Reagenz	Spezifikation
DNA 1 (Erkennungsspezie 1)	TexasRed-5'-AAA-TGC-ATG-TCG-TCG-TGA-TGT-AAA-3'
DNA 2 (Marker 1)	5'-ATT-GTC-ATA-ATC-ATC-TTG-AGA-CGC-TTT-TTT-TTT-TTT-ACA-TCA-CGA-CGA-CAT-GCA-TTT-3'
DNA 3 (Erkennungsspezie 2)	Biotin-5'-GCG-TCT-CAA-CAT-GAT-TAT-GAC-AAT-3'
Antikörper (Erkennungsspezie 3)	Streptavidin-konjugiertes anti-Human IgG F(ab') ₂ (Ziege)
Antigen (Marker 2)	Fluorescein-markiertes Human IgG F(ab') ₂ Fragment

5 Tabelle 1: verwendete Erkennungsspezien und Marker

Beispiel 1

- 10 1 nmol TexasRed-markiertes Oligonucleotidkonjugat (DNA 1), 1 nmol Biotin-markiertes Oligonucleotidkonjugat (DNA 3) und 1 pmol des 57-meren Oligonucleotids (DNA 2) wurden in jeweils 150 µl Hybridisierungspuffer (5 x SSC, 0,02 % SDS) aufgenommen. Anschließend wurde für 30 min auf 60 °C erwärmt, miteinander vermischt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Man ließ auf Raumtemperatur (RT) abkühlen, addierte 1 nmol des Streptavidin-anti-Human-IgG
- 15 F(ab')₂-Konjugats und 1 nmol des Fluorescein-markierten IgG F(ab')₂-Fragments und ließ über Nacht bei RT stehen. Der sich bildende Komplex wurde durch eine gelbe Bande in einem nicht-denaturierenden Gel (15%-iges TEB-Gel, Fa. BioRad) nachgewiesen.

Beispiel 2:

1 nmol Biotin-markiertes Oligonucleotidkonjugat (DNA 1), 1 nmol Biotin-markiertes Oligonucleotidkonjugat (DNA 3) und 1 pmol des 57-meren Oligonucleotids (DNA 2) wurden in jeweils 150 µl Hybridisierungspuffer (5 x SSC, 0,02 % SDS) aufgenommen. Es wurde für 5 min auf 60 °C erwärmt, miteinander vermischt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Man ließ auf Raumtemperatur (RT) abkühlen und gab die Lösung auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte (Fa. BIOTEZ, Best.-Nr. 040298920). Die überstehende Lösung wurde abpipettiert und der Träger 5x mit 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Nun addierte man 200 µl einer, bei RT für 2 h vorinkubierten Lösung aus 200 µl Streptavidin-anti-Human-IgG F(ab')₂ (Ziege)-Lösung (1,6 mg/ml) und 40 µl des Fluorescein-markierten IgG F(ab')₂-Fragment-Lösung (5,0 mg/ml) und ließ 1-2 h bei RT inkubieren. Die überstehende Lösung wurde wiederum abpipettiert und der Träger 5x mit 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Durch das Messen der Fluoreszenz des Fluoresceins ($\lambda_{\text{max,A}}$: 494 nm, $\lambda_{\text{max,E}}$: 525 nm) wurde die Bildung des Komplexes nachgewiesen.

Reagenz	Spezifikation
DNA 1' (Erkennungsspezie 1')	Biotin-5'-AAA-TGC-ATG-TCG-TCG-TGA-TGT-AAA-3'
DNA 2 (Marker 1)	5'-ATT-GTC-ATA-ATC-ATC-TTG-AGA-CGC-TTT-TTT-TTT-TTT-ACA-TCA-CGA-CGA-CAT-GCA-TTT-3'
DNA 3 (Erkennungsspezie 2)	Biotin-5'-GCG-TCT-CAA-CAT-GAT-TAT-GAC-AAT-3'
Antikörper (Erkennungsspezie 3)	Streptavidin-konjugiertes anti-Human IgG F(ab') ₂ (Ziege)
Antigen (Marker 2)	Fluorescein-markiertes Human IgG F(ab') ₂ Fragment

Tabelle 2: verwendete Erkennungsspezien und Marker

5

Patentansprüche

1. Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:
 - (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezies, die den ersten Marker erkennt,
 - 10 (b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezies, die sowohl den ersten Marker, wie auch den zweiten Marker erkennt,
 - (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezies, die den zweiten Marker erkennt,
 - (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten
15 Erkennungsspezies und Markern.
2. Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:
 - (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezies, die den ersten Marker erkennt,
 - 20 (b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezies, die den ersten Marker und eine dritte Erkennungsspezies erkennt,
 - (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezies, die den zweiten Marker und die zweite Erkennungsspezies erkennt,
 - (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten
25 Erkennungsspezies und Markern.
3. Nachweisverfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Erkennungsspezies, die weitere Marker erkennen, in weiteren Behandlungsschritten eingesetzt werden.

4. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Erkennungsspezies, vorzugsweise die erste Erkennungsspezies, an einen Träger immobilisiert wird.

5

5. Nachweisverfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ausgewählt ist aus einem festen oder gelartigem Material, insbesondere Chipmaterial und/oder dünne Schichten des Materials, vorzugsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien oder (bio)molekulare Filamente, insbesondere Cellulose oder Gerüstproteine.

10

6. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Erkennungsspezies und/oder der Marker eine synthetische Substanz, ein Naturstoff und/oder ein Naturstoffderivat ist, vorzugsweise ausgewählt aus einem Peptid, Peptoid, Protein, Saccharid oder einer Nukleinsäure.

15

7. Nachweisverfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat ausgewählt ist aus einem Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon, insbesondere aus der extrazellulären Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, einem Antikörper oder einem funktionellen Teil davon, insbesondere einem Fv-Fragment, einem einzelkettiges Fv-Fragment (scFv) oder einem Fab-Fragment, einem Zellbestandteil, insbesondere einem Lipid, Glykoprotein, Filamentbestandteil, Lectin, Liposom, Mitogen, Antigen, sekundärer Metabolit oder Hapten, einer Zelle, insbesondere einer lymphoide Zelle, oder einem Virus, insbesondere einem Virusbestandteil, vor allem einem Kapsid, oder einem Viroid, oder einem Derivat, insbesondere einem Acetat, oder deren wirksame Teile, oder einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure, insbesondere eine natürliche Nukleinsäure in Form einer DNA oder RNA oder eine nicht-natürliche Nukleinsäure, vorzugsweise p-RNA, p-DNA, PNA oder CNA, oder Hybriden der genannten Substanzen.

20

25

30

8. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennung eines Markers durch eine Erkennungsspezies über nicht-kovalente Wechselwir-

kungen erfolgt, insbesondere über Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelungen, Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe, Van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen.

- 5 9. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezies markiert ist, insbesondere sind alle Erkennungsspezies markiert, vorzugsweise sind mindestens zwei Erkennungsspezies unterschiedlich markiert.
- 10 10. Nachweisverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung oder radioaktive Markierung, vorzugsweise eine LOCI-Markierung, FRET-Markierung, Fluoreszenz-Quenching-Markierung, SPA-Markierung, Fluoreszenzmarkierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung oder Spinmarkierung ist.
- 15 11. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker und/oder das Signal amplifiziert wird.
- 20 12. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis gemäß Schritt (d) des Verfahrens kompetitiv erfolgt.
- 25 13. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Marker eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jeder weitere Marker eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen ist.
- 30 14. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Marker und jeder weitere Marker eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer natürlichen Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen ist.

15. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure als Marker von einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure als Erkennungsspezies erkannt wird.
16. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat von einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise von einem Antikörper oder einem Antikörperderivat als Erkennungsspezies erkannt wird.
17. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezies eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jede weitere Erkennungsspezies eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
18. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Erkennungsspezies und jede weitere Erkennungsspezies eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
19. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezies ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist.
20. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezies ein Hybrid aus einer synthetischen Substanz, einem Natur-

stoff oder einem Naturstoffderivat und einer anderen synthetischen Substanz, einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat ist.

- 5 21. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezies ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, einem verschiedenen Naturstoff oder einem verschiedenen Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
- 10 22. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezies eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist, eine zweite Erkennungsspezies ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist
- 15 23. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezies eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist, eine zweite Erkennungsspezies ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist, und die dritte Erkennungsspezies eine weitere andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist.
- 20 24. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezies eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, eine zweite Erkennungsspezies ein Hybrid aus einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise aus einem Antikörper oder Antikörper-Derivat, und einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat, vorzugsweise ein anderer Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und eine dritte Erkennungsspezies eine weitere andere
- 25 30

synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein weiterer anderer Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.

- 5 25. Testsystem enthaltend mindestens zwei Erkennungsspezien, die mindestens zwei verschiedene Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen.
26. Testsystem nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie an einen Träger immobilisiert ist.
- 10 27. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist und mindestens eine andere Erkennungsspezie eine andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist.
- 15 28. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und mindestens eine andere Erkennungsspezie eine andere von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
- 20 29. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und eine von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
- 25 30. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngi-
- 30

gen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist.

- 5 31. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungspezie ein Hybrid aus einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und einer anderen von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
- 10 32. Verfahren zur Herstellung eines Testsystems gemäß einem der Ansprüche 25-31, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Erkennungsspezien zusammengestellt werden.
- 15 33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungspezie an einen Träger immobilisiert wird.
34. Verwendung des Testsystems nach einem der Ansprüche 25-31 zum Nachweis von An- und/oder Abwesenheit von mindestens zwei verschiedenen Markern in einer Probe.
- 20 35. Verwendung des Testsystems nach Anspruch 32 in Form eines Diagnostikums oder eines Analyten.
- 25 36. Verwendung des Testsystems nach Anspruch 32 oder 33 für den Nachweis einer Erkrankung oder für die Umweltanalytik, insbesondere zum Nachweis von Krankheitserregern, Markern von Krankheiten, Toxinen und/oder Allergenen.

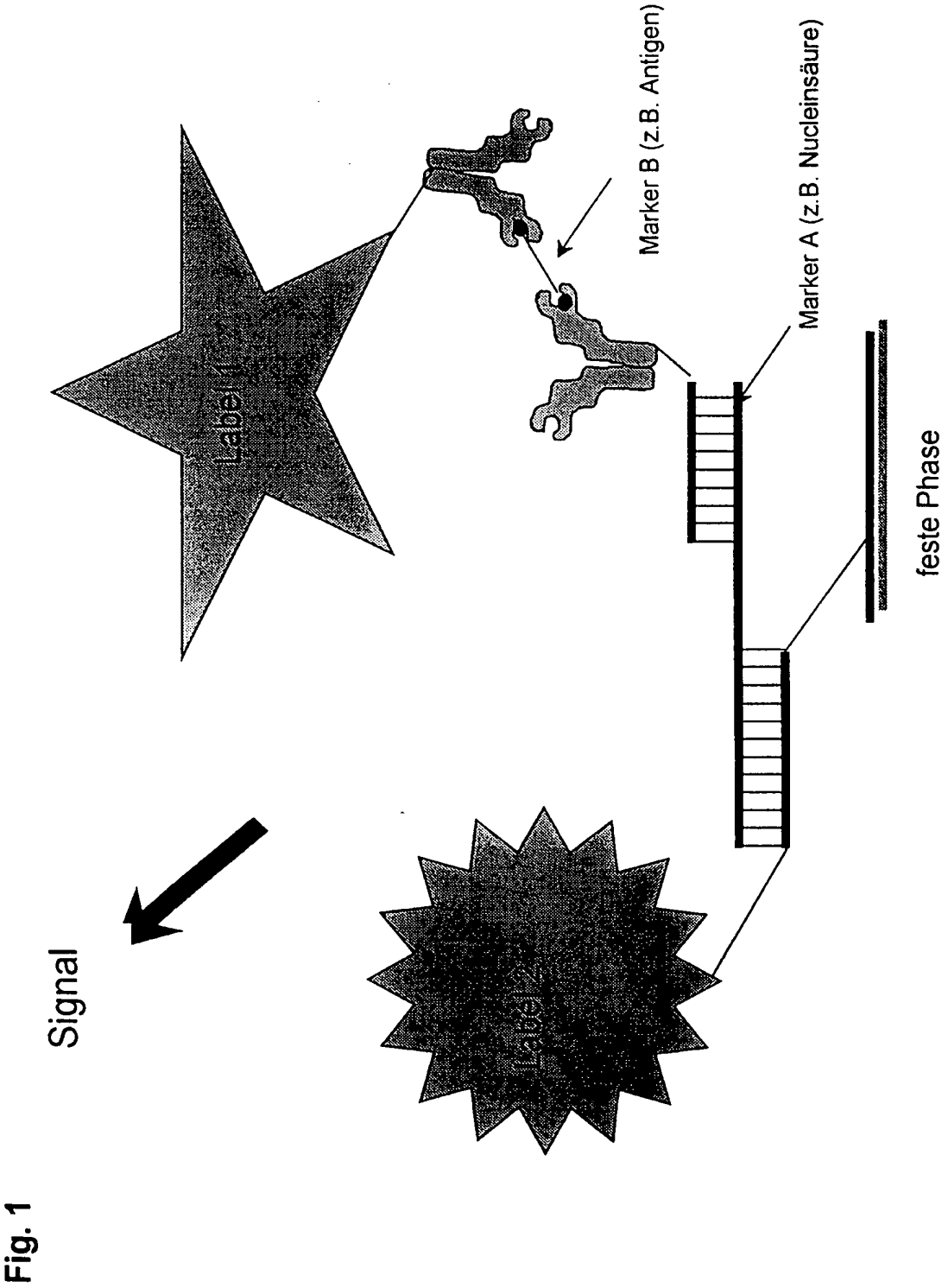


Fig. 2 **Signal**

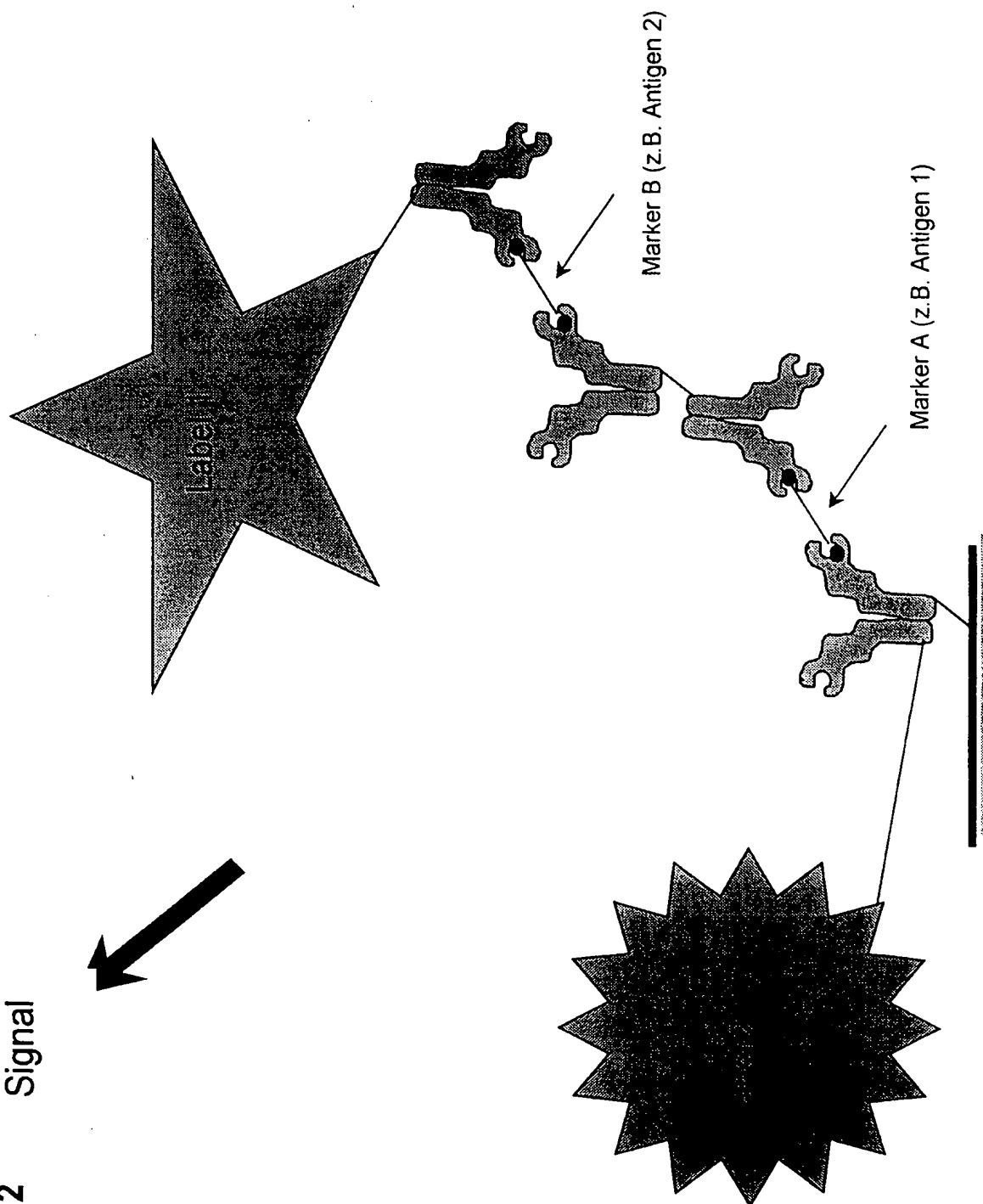


Fig. 3

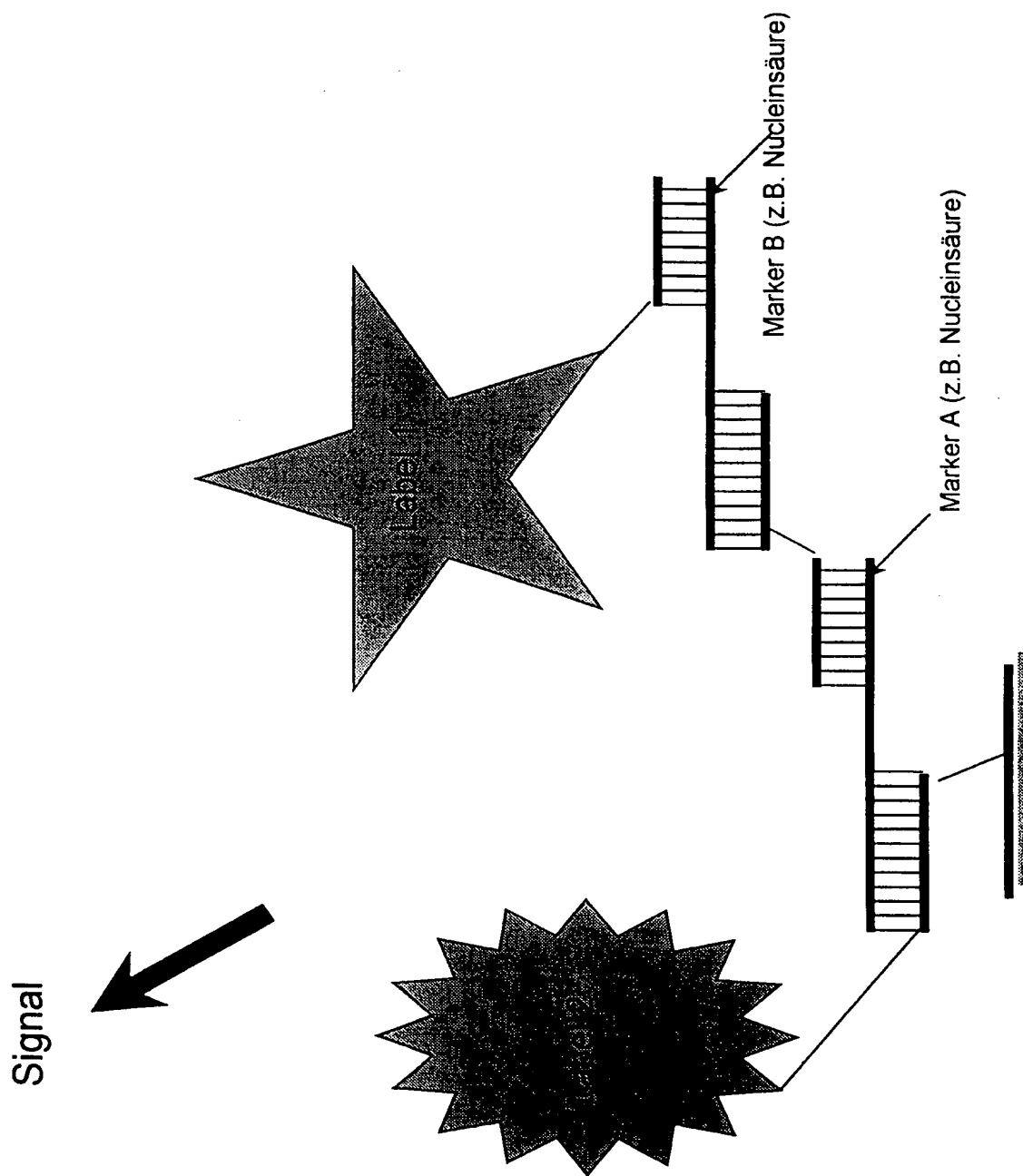


Fig. 4

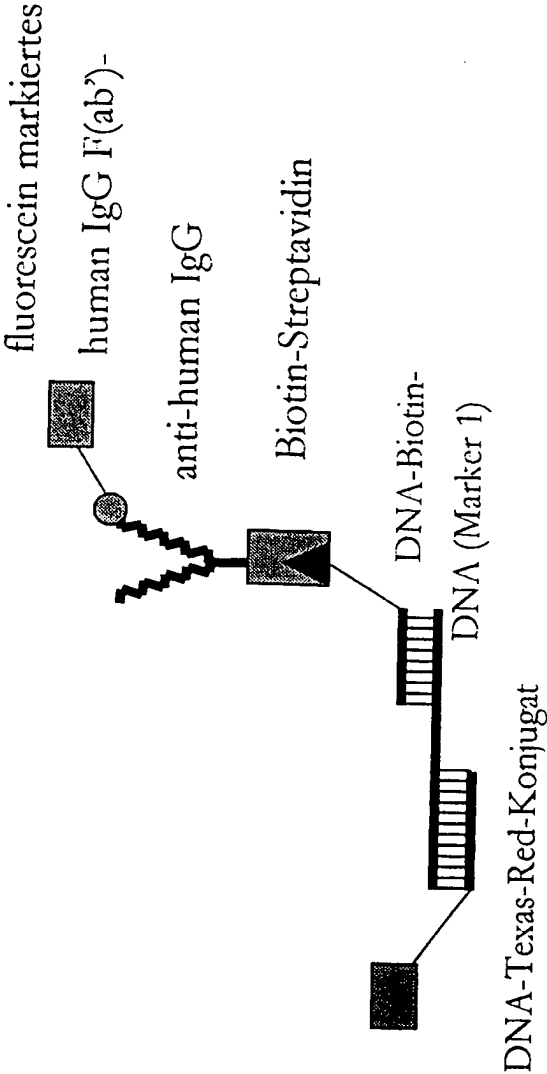


Fig. 5

